УДК: 576.535:57.086.13:34.25

Р.Я. Подчерняева, Г.Р. Михайлова, Г.А. Данлыбаева, А.Д. Петрачев, О.М. Гринкевич, Е.Л. Фирсова

ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН

ЗНАЧЕНИЕ КРИОБАНКА ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ПОЗВОНОЧНЫХ ДЛЯ ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Криобанк перевиваемых клеточных линий позвоночных на базе лаборатории культур тканей насчитывает более 200 линий, из которых 125 полностью паспортизованы и опубликованы в каталогах [1, 2, 3]. В Коллекции имеются культуры клеток человека (перевиваемые, диплоидные, монослойные и суспензионные лимфобласто-

Таблица 1

Вирусы	Чувствительные культуры клеток
РНК – вирусы	
Полиовирусы (1-3 типов)	HeLa, Hep-2, BSC-1, Chang Conjunktiva 1-5C-4, GMK-AH 1, Vero, CV-1, Chang liver, RD, BGM , LLC-MK_2 , Vero
Коксаки А (1-26 типов)	Hep-2, HeLa, RD, BGM, RK-13, LLC-MK_2
Коксаки В (1-6 типов)	Hep-2, HeLa, MDCK, BGM, PK-15, LLC-MK_2
Вирусы ЕСНО (1-28 типов)	Hep-2, HeLa, Vero, RD, BGM, RK-13, LLC-MK_2
Ротавирусы	MA-104, MDBK
Риновирусы	LLC-MK_2, BGM, HeLa, диплоидные эмбриональные клетки легкого эмбриона человека (ЛЭЧ)
Пневмовирусы (респираторно-синцитиальные)	HeLa, Hep-2, Fl, Vero, BSC-1
Реовирусы	BGM, PK-15(2-3 тип), Tb1Lu(тип 3), Mv1Lu(тип 3)
Арбовирусы	
Западный и Восточный, энцефалиты лошадей, Венесуэльский энцефалит, лихорадка Чикунгунья и леса Семлики	Vero, CV-1, СПЭВ, RS-537, L-929, MA-104, Raji, T-1387, Namalva, Molt-4, куриные фибробласты (ФЭК)
Клещевой и японский энцефалиты, лихорадка Денге, желтая лихорадка	IB-RS-2, PS, BSC-1, MA-104, СПЭВ, ППЭС, CV-1, 4647
Буньявирусы, Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом	BHK-21, A-549, LLC-MK2, Vero, Vero E6
Вирусы гриппа А(H1N1, H2N2, H3N2)	LLC-MK_2, BHK-21, СПЭВ, MDCK, 4647, Mpf, Chang conjunctiva 1-5C-4
Вирус гриппа В	MDCK, СПЭВ
Вирус гриппа птиц	L 41, Chang conjunctiva 1-5C-4, HT 29, MDCK, СПЭВ
Штамм А/крачка ЮА/61 (H5N3)	Vero, CRFK, CC-81, L 929, куриные фибробласты (ФЭК)
Вирусы парагриппа человека (1-4 типов), паротита, штамм Сендай	Vero, MA-104, Hep-2, 4647, L 929, диплоидные клетки легкого эмбриона человека (ЛЭЧ)
Гепатит А	Alexander, Frhk-4/R, Vero, CV-1, BSC-1, 4647, LLC-MK_2, Vero(B), первичные фибробласты эмбриона человека (ФЭЧ)
ДНК - вирусы	
Гепатит В	Vero, CV-1, A-549
Гепатит С	CH-5, Lunet
Вирусы простого герпеса человека (1-2 типов)	RK-13, Vero, NiH/3T3, BHK-21, Hep-2, BSC-1, CV-1, RS-537, L tk(-), 3T3 BALB/C, RD, RAG, Y-1, Mv1Lu, Vero (B), 4647, диплоидные клетки легкого эмбриона человека (ЛЭЧ)
Цитомегаловирус	Vero, диплоидные клетки легкого и фибробластов человека (ЛЭЧ, ФЭЧ)
Аденовирусы (1-31 типов)	HeLa, Hep-2, Vero, PS, MDCK, A-549, 293, GMK AH1, PK-15 Chang liver, 4647

Таблица 2

Репродукция вирусов гриппа птиц в культурах клеток животных и человека

№ п/п	Культуры клеток животных	Штамм			
		А/крачка/ЮА/61 (H5N3)		А/утка/Новосибирск 56/05 (H5N1)	
		Титр ГА	ТЦД$_{50}$ (lg)	Титр ГА	ТЦД$_{50}$ (lg)
1	MDCK	64	4,5	256	7,8
2	СПЭВ	128	4,5	256	7,5
3	Vero	8	2,0	16	3,0
4	CRFK	128	5,0	256	3,0
5	CC-81	64	2,0	128	2,0
6	L_{929}	2	1,0	4	1,0
7	ФЭК	16	3,0	64	7,0
8	Mpf	0	<1,0	128	3,0
№ п/п	Культуры клеток человека	Штамм			
		А/крачка/ЮА/61 (H5N3)		А/утка/Новосибирск 56/05 (H5N1)	
		Титр ГА	ТЦД$_{50}$ (lg)	Титр ГА	ТЦД$_{50}$ (lg)
1	A_{549}	0	<1,0	0	<1,0
2	ЛЭЧ	0	<1,0	2	1,0
3	Chang liver	0	<1,0	2	1,0
4	CH_5	0	<1,0	4	1,0
5	Lunet	0	<1,0	2	1,0
6	L_{41}	8	1,0	8	1,0
7	1-5C-4	16	2,0	64	2,8
8	HT-29	64	5,0	128	8,0

идные), и многих видов животных (обезьян, мышей, хомячков, свиней, собак, крыс, кроликов, овец, кошек и др.), в том числе отсутствующие в других Каталогах. Коллекционные клеточные линии используются для обеспечения фундаментальных и прикладных научных исследований в области биологии и медицины. Данные по чувствительности клеток позвоночных к ряду наиболее распространенных вирусов человека, которые применяются для вирусологических исследований, представлены в таблице 1.

Нами изучен спектр клеточных культур, чувствительных к вирусам гриппа птиц (H5N1 и H5N3), изолированных в 1961 и 2005 г.г., в 16 видах клеточных культур человека и животных (таблица 2).

Из таблицы видно, что штамм А/утка/Новосибирск 56/05 имеет более широкий спектр хозяев, чем штамм А/крачка ЮА/61. Наиболее чувствительными клеточными линиями являются почки собаки (МДСК), свиней (СПЭВ), обезьян (Vero), кошек (CRFK), клетки кишечника человека (НТ 29) и первичнотрипсинизированные клетки куриных фибробластов (ФЭК). Штамм А/утка/Новосибирск 56/05 репродуцируется в клетках мозга хорька (Mpf) в отличие от штамма А/крачка ЮА/61 [4].

Для сохранения генофонда коллекционных клеточных линий были отработаны оптимальные условия их криоконсервации.

Работу проводили на автоматическом программном аппарате Minicool LC-40 (Франция) с учетом следующих параметров: плотности клеточной суспензии, концентрации сыворотки, среды и криопротектора, температуры консервации, скорости охлаждения клеток.

Оптимальные условия замораживания большей части культур включали использование клеточной суспензии в концентрации 3-4 млн клеток/мл, 10-20% сыворотки эмбрионов коров, добавление в питательную среду 1/3 кондиционированной среды и в качестве криопротектора 10% глицерина.

Установлено, что большая часть клеточных линий даже при длительном хранении (свыше 20 лет) являются криорезистентными, сохраняя достаточно высокую жизнеспособность (больше 80%).

РЕЗЮМЕ

Представлены перевиваемые клеточные линии позвоночных чувствительные к РНК- и ДНК- вирусам. Изучена репродукция вирусов гриппа птиц (H5N1 и H5N3) в 16 типах клеток. Показано, что ви-

рус, изолированный в 2005 г. обладает большей репродуцирующей активностью по сравнению с вирусом 1961 г. Отработаны оптимальные условия криоконсекрвации для сохранения генофонда Коллекционных линий.

SUMMARY

There are present continuous cell lines sensitive to RNA and DNA viruses. It is studied reproduction of avian influenza viruses (H5N1 and H5N3) in 16 types of cells. It is shown that virus, which was isolated in 2005 year, has more reproductive activity, than virus of 1961 year. Were work out the optimal conditions of cryoconservation for genofond maintenance collection cell lines.

Литература

1. Каталог Всесоюзной Коллекции клеточных культур. Л.: Наука, 1991.
2. Каталог Российской Коллекции клеточных культур (РККК). С. Петербург, Омск, 1999.
3. Human and animal cell lines catalog. Ed B Parodi et al, Italy. 1993.
4. Подчерняева Р.Я., Исаева Е.И., Данлыбаева Г.А., Михайлова Г.Р. Репродукция вирусов гриппа в культуре клеток мозга хорька Mpf (Mustela putorius furo) // Ветеринарная патология, 2006, С. 107-111.

Н.П. Глинских, А.А. Бахарев, П.В. Устьянцев, И.В. Устьянцев

ФГУН Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций Роспотребнадзора

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРИОБАНКОВ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР В ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Успех решения проблем теоретической и прикладной вирусологии и биотехнологии зависит от качественной характеристики клеточных культур, используемых в экспериментальной, диагностической и производственной работе. В культурах, поддерживаемых путем длительного серийного пассирования, наблюдается выраженная тенденция к непрерывному изменению основных характеристик, что обусловлено целым рядом факторов: составом и качеством питательных сред и сыворотки, условиями и режимом культивирования. Изменения затрагивают чаще всего культуральные свойства клеточных линий, но нередки и более глубокие сдвиги, вплоть до изменения кариотипа и видовой принадлежности вследствие контаминации клеток в процессе пассирования. С учетом этого особое значение приобретает не только вопрос получения клеточных культур для обеспечения тех или иных экспериментально - диагностических исследований и производственных разработок, но и задача сохранения таких культур с неизменными биологическими характеристиками. Поэтому вполне закономерной является постановка вопроса о создании отраслевых стандартов клеточных культур с регламентированными биологическими свойствами, определяющими качественный уровень проводимых исследований. Эти стандарты должны отразить главные требования к клеточному субстрату и выделить основные критерии для паспортизации переживаемых клеточных линий и штаммов.

Исследования по отдельным разделам стандартизации клеточных культур, используемых в вирусологии, были начаты в 1996 г. в соответствии с задачами, стоящими перед Екатеринбургским НИИВИ как головным учреждением Минздрава России по проблеме «Вирусология и вирусные заболевания». Проведены, в частности, исследования по разработке условий получения стабилизированных линий клеток; методов деконтаминации клеточных культур от микоплазм; анализу криоустойчивости клеточных культур с целью выбора оптимального режима их консервации. Одной из конечных целей этих разработок являлось создание условий обеспечения вирусологических лабораторий России стабилизированными клеточными культурами. Поэтому исследования, посвященные проблеме стандартизации клеточных культур в последующем были расширены и проведены по следующим направлениям: оптимизация условий культивирования перевиваемых клеток на основе стандартизации естественного компонента сред роста и выбора критериев оценки качества питательных сред; разработка условий получения линий перевиваемых клеток, отличающихся выраженной стабильностью своих морфофизиогических свойств и высокой чувствительностью к вирусам;